

# Associação independente da variante rs1333049, no locus 9p21, com a doença coronária, numa população portuguesa [45]

ISABEL MENDONÇA, ROBERTO PALMA DOS REIS, ANDREIA PEREIRA, HUGO CAFÉ, MARCO SERRÃO, ANA CÉLIA SOUSA, ANA ISABEL FREITAS, GRAÇA GUERRA, SÓNIA FREITAS, CAROLINA FREITAS, ILÍDIO ORNELAS, ANTÓNIO BREHM, JOSÉ JORGE ARAÚJO

Unidade de Investigação e Serviço de Cardiologia do Hospital Nélcio de Mendonça (SESARAM), Funchal, Portugal  
Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira, Funchal, Portugal  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

**Rev Port Cardiol 2011; 30 (06): 575-591**

## RESUMO

**Introdução:** Estudos recentes de associação genómica em larga escala (GWAS) identificaram vários polimorfismos de um único nucleótido (SNP), localizados no locus 9p21, associados com doença arterial coronária (DAC). De entre eles o SNP rs1333049 demonstrou uma associação consistente com a DAC tendo sido reproduzida, com sucesso, em várias populações.

**Objectivo:** Investigar se a nova variante rs1333049, no cromossoma 9p21, é um factor de risco independente para DAC, na população Portuguesa.

**Material e métodos:** Estudo caso-controlo, que incluiu 1406 indivíduos, 723 doentes coronários internados consecutivamente (idade média de 53,7±8,9 anos 79,9% do sexo masculino) e 683 controlos sem doença coronária (idade média de 53,3±10,5 anos, 73,9 % do sexo masculino) seleccionados para não serem significativamente diferentes quanto ao sexo e idade. Estudou-se o SNP rs1333049, em todos os indivíduos, com recurso à técnica convencionada de PCR combinada com a técnica TaqMan

## Independent association of the variant rs1333049 at the 9p21 locus and coronary heart disease

## ABSTRACT

**Introduction:** Recent genome-wide association studies have identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at the 9p21 locus as risk factors for coronary artery disease (CAD). Among them, the SNP rs1333049 has demonstrated a consistent association with CAD, which has been successfully replicated in several populations.

**Aim:** To investigate whether the SNP rs1333049 located on the 9p21 chromosome is an independent risk factor for CAD in a Portuguese population.

**Methods:** We performed a case-control study which included 1406 individuals, 723 consecutive coronary patients (mean age 53.7±8.9 years, 79.9% male) and 683 controls without coronary disease (mean age 53.3±10.5 years, 73.9% male). Cases and controls were selected so as not to be significantly different in terms of gender and age. We studied the SNP

(Applied Biosystems). Determinou-se a distribuição alélica e genotípica (C/G), *odds ratio* e respectivo intervalo de confiança para risco de DAC.

Foi construído um modelo de regressão logística *forward wald* ajustado para a idade, sexo, factores de risco convencionais, marcadores bioquímicos e genótipos em estudo, afim de avaliar quais as variáveis associadas de forma significativa e independente com DAC.

**Resultados:** 60% dos doentes coronários e 53% dos controlos apresentaram o alelo C (OR=1,33; p=0,0002), 35,7% dos doentes e 29,3% dos controlos tinham o genótipo homozigoto CC (OR=1,34;p=0,010).

O heterozigoto CG estava presente em 48,1% dos doentes e 47% nos controlos, não atingindo significância estatística, para risco vascular (OR=1,05;p=0,670). Após análise multivariada de regressão logística o genótipo CC do cromossoma 9p21 ficou na equação com um OR=1,7, p=0,018 e o genótipo heterozigoto CG com um OR=1,5, p=0,048.

**Conclusão:** Com o presente trabalho replicou-se, numa população portuguesa, o risco coronário ligado à nova variante rs1333049 do cromossoma 9p21.

A robustez deste genótipo, tanto em homo como em heterozigotia, tem sido consistente e relevante na estratificação de risco para a DAC, mesmo em contextos populacionais muito diversos. Nestas circunstâncias, a utilização do genótipo CC ou CG poderá vir a revelar-se útil para a previsão do risco de DAC na nossa população.

**Palavras-chave:**

Factores de risco; Polimorfismos genéticos;  
Doença arterial coronária; Locus 9p21;

rs1333049 at the 9p21 locus in all individuals, using standard PCR combined with the TaqMan technique (Applied Biosystems). The allelic and genotype distribution (C/G), odds ratios and corresponding confidence intervals for CAD risk were determined. A forward Wald logistic regression analysis model was constructed, adjusted for age, gender, conventional risk factors, biochemical markers and the genotypes under study, in order to determine which variables were linked significantly and independently with CAD.

**Results:** The C allele was found in 60% of the CAD patients and 53% of the controls, with OR=1.33; p=0.0002. The CC genotype appeared in 35.7% of CAD patients, with OR=1.34, p=0.010. The heterozygous CG genotype was present in 48.1% of the CAD patients and 47% of the controls, and did not present vascular risk (OR=1.05, p=0.670). After logistic regression analysis, the CC genotype remained in the equation with OR=1.7; p=0.018 and CG with OR=1.5, p=0.048.

**Conclusion:** In the present study we replicated the coronary risk linked to the recently discovered variant rs1333049 on the 9p21 chromosome in a Portuguese population. Although the mechanism underlying the risk is still unknown, the robustness of this risk allele in risk stratification for CAD has been consistent, even in very different populations. The presence of the CC or CG genotype may thus prove to be useful for predicting the risk of developing CAD in the Portuguese population.

**Key words:**

Risk factors; Genetic polymorphisms;  
Coronary artery disease; Locus 9p21.

## INTRODUÇÃO

A doença das artérias coronárias (DAC) é actualmente um dos maiores problemas de saúde no mundo e também no nosso país, devido à sua enorme prevalência e elevada mortalidade. Como foi demonstrado em estudos efectuados em gémeos e famílias, o desenvolvimento da DAC tem um fundo genético consistente<sup>(1,2)</sup>.

Recentemente a utilização de tecnologias de alta precisão na análise genética e os estudos de associação genómica em larga escala (GWAS), simultaneamente, identificaram um locus no cromossoma 9p21.3, que apresentou uma forte associação com a DAC<sup>(3, 4)</sup>. Esta associação estende-se ao longo de uma região superior a 100 kilobases (Kb) na qual foram identificados vários polimorfismos de um único nucleótido (SNPs) sendo o rs1333049 o que apresentou a associação mais forte com a DAC. Esta associação é mais intensa a alguma distância dos genes mais próximos que codificam proteínas (CDKN2A, CDKN2B, e MTAP). A zona de interesse era atravessada, quase completamente, por um gene recentemente identificado, “antisense” e não codificante, denominado ANRIL.

O sinal de associação estende-se ao longo de um segmento onde não existem genes codificadores e o SNP com a associação mais intensa é o rs1333049 que se encontra aproximadamente a 100 Kb dos genes codificadores mais próximos, o CDKN2A que codifica a proteína p16<sup>INK4a</sup> e CDKN2B que codifica a p15<sup>INK4B</sup>, sendo a P14<sup>ARF</sup> codificada por exões alternativos do gene CDKN2A e do gene MTAP, situado também nesta zona.

Estes genes, CDKN2A e CDKN2B, são considerados supressores tumorais e codificam proteínas inibidoras do ciclo celular, as quinases ciclina-dependentes (CDKs), que desempenham um papel importante na regulação do ciclo celular, podendo as mutações destes genes estar implicadas na patogénese da arteriosclerose e de certos tumores malignos como o melanoma<sup>(5,6)</sup>.

A demonstração de associação entre os nucleótidos de um único polimorfismo (SNPs) situados nos loci de risco coronário e a doença, em outras amostras independentes, é de interesse primordial para a validação dos resultados dos estudos.

## INTRODUCTION

Coronary artery disease (CAD) is one of the greatest health problems worldwide and in Portugal, with extremely high prevalence and mortality. Twin and family studies have demonstrated that the development of CAD has a strong genetic component<sup>(1, 2)</sup>.

High-precision genetic analysis techniques, together with genome-wide association studies, have recently identified a locus on chromosome 9p21.3 that is strongly associated with CAD<sup>(3, 4)</sup>. This association extends across a region of over 100 kilobases (kb) on which several single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified, of which rs1333049 has the most consistent link with CAD. The association is strongest some distance from the closest protein-coding genes (CDKN2A, CDKN2B, and MTAP). The region of interest is almost completely spanned by a recently identified non-coding antisense gene denominated ANRIL.

The signal extends across a segment where there are no protein-coding genes; rs1333049 is almost 100 kb from the nearest genes, CDKN2A (encoding p16<sup>INK4a</sup>) and CDKN2B (p15<sup>INK4b</sup>); p14<sup>ARF</sup> is encoded by alternative exons of CDKN2A and by MTAP, which is located in the same region. CDKN2A and CDKN2B code for cyclin-dependent kinase inhibitors that play an important role in regulation of the cell cycle; mutations in these genes have been implicated in the pathogenesis of arteriosclerosis and certain malignant tumors, including melanoma<sup>(5, 6)</sup>.

In order to validate these studies, it is essential to replicate the association between SNPs in regions of coronary risk and disease in other populations. Lack of reproducibility is one of the main problems with genetic association studies, and results must be replicated in various populations in order to clarify the contribution to the pathogenic process of the factors under study<sup>(7, 8)</sup>. Populations differ not only in genetic profile but also in their environments and lifestyles.

This study aims to investigate the association of the SNP rs1333049 located on the

A falta de reprodutibilidade é um dos grandes problemas nos estudos de associação e a replicação dos resultados em várias populações torna-se indispensável para clarificar a contribuição dos factores investigados no processo patogénico<sup>(7, 8)</sup>. As populações diferem não somente no perfil genético, mas também no meio ambiente que partilham e no estilo de vida. Deste modo, justifica-se replicar estes estudos de base genética em populações diferentes, com perfis genéticos e comportamentais diferentes.

Neste estudo propomo-nos investigar a associação do SNP rs1333049, localizado no locus do cromossoma 9p 21.3, com a DAC numa população Portuguesa.

## MATERIAL E MÉTODOS

Estudo caso-controlo, que incluiu 1406 indivíduos, 723 doentes coronários consecutivos (idade média 53,7±8,9 anos, 79,9% sexo masculino) e 683 controlos sem doença coronária conhecida (idade média 53,3±10,5 anos, 73,9% do sexo masculino). Os doentes foram seleccionados consecutivamente das altas hospitalares (2002-2006) entre os admitidos por enfarte do miocárdio (EM) confirmado usando os critérios da *Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee*<sup>(9)</sup>, ou doença coronária confirmada por coronariografia com pelo menos 75% de obstrução de uma artéria coronária principal. O grupo controlo foi constituído por voluntários saudáveis seleccionados das listas eleitorais, sem história sugestiva de DC. Para cada controlo efectuava-se uma observação clínica com referência aos factores de risco tradicionais, um ECG e em casos duvidosos, um teste de esforço e um eco-doppler cardíaco. Casos e controlos foram seleccionados de forma a não serem significativamente diferentes em termos de sexo e idade.

O uso das listas eleitorais para seleccionar os controlos tinha a finalidade de assegurar que não diferiam, de forma significativa, dos casos em termos de sexo e idade. Todos os indivíduos deram o seu consentimento informado. O protocolo do estudo teve a aprovação da Comissão de Ética do nosso Hospital.

9p21 chromosome with CAD in a Portuguese population.

## METHODS

We performed a case-control study which included 1406 individuals, 723 consecutive coronary patients (mean age 53.7±8.9 years, 79.9% male) and 683 controls without coronary disease (mean age 53.3±10.5 years, 73.9% male). The cases were selected from patients discharged between 2002 and 2006 after being admitted for myocardial infarction diagnosed according to the criteria of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee<sup>(9)</sup>, or with CAD confirmed by coronary angiography with at least 75% occlusion of a major coronary artery. The control group consisted of healthy volunteers selected from electoral rolls, with no history of CAD. All controls underwent clinical assessment of conventional cardiovascular risk factors, an ECG, and, in doubtful cases, exercise testing and cardiac Doppler echocardiography. Cases and controls were selected so as not to be significantly different in terms of gender and age.

Electoral rolls were used for selection of controls in order to ensure that they did not differ significantly from cases in terms of gender and age. Informed consent was obtained from all participants and the study protocol was approved by the hospital's ethics committee.

The data, which were stored in a standardized database, included demographic and clinical characteristics and conventional risk factors (gender, age, body mass index [BMI], diabetes, hypertension, family history, smoking, alcohol consumption and physical activity. Conventional risk factors were defined on the basis of previously published standard criteria<sup>(10-13)</sup>. All participants underwent biochemical tests and genetic analysis for the SNP rs1333049.

## Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a standard salting-

Os dados foram guardados numa base “standard”, que compreendia dados demográficos, características clínicas e factores de risco clássicos (género, idade, índice de massa corporal, diabetes, hipertensão arterial, história familiar, hábito de fumar, de beber e tipo de actividade física). A definição dos factores de risco convencionais foi baseada nos critérios “standard” descritos previamente<sup>(10-13)</sup>. Foram efectuadas, em todos os participantes, análises bioquímicas e genéticas (SNP rs 1333049).

### Análise genética

O ADN genómico foi extraído das células leucocitárias do sangue periférico usando o método standard de “salting-out”. A análise genotípica foi efectuada usando sonda oligonucleotídica marcada com fluorescência específica para cada um dos alelos num ensaio que combina a técnica convencional de PCR e a técnica TaqMan (Applied Biosystems). Os “primers” e as sondas eram as pré-estabelecidas pelo fornecedor (*TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems*) para o polimorfismo a analisar (SNP rs1333049). Os oligonucleotídeos foram sintetizados e os marcadores fluorogénicos FAM e VIC acoplados às extremidades 5’ das sondas de modo a alcançar a discriminação alélica. A reacção de polimerização em 2 passos consistiu, de uma forma geral, em 40 ciclos de desnaturação a 92°C durante 15 segundos e de “primer annealing” e extensão a 60°C durante 1 minuto e foi efectuada num aparelho 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os genótipos foram determinados recorrendo ao Software (*Applied Biosystems*) sem qualquer conhecimento prévio dos dados clínicos individuais (Fig. 2).

out method. For the genetic analysis, oligonucleotide probes with fluorescent tags specific to each allele were used in an assay that combines conventional PCR and the TaqMan technique (Applied Biosystems). The primers and probes used were as specified by the manufacturer (TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems) for the SNP under analysis. The oligonucleotides were synthesized and the FAM and VIC tags were coupled to the 5’ end of the probe in order to discriminate the allele. A two-stage polymerase reaction was used, consisting of 40 cycles of denaturation at 92 °C for 15s and primer annealing and extension at 60 °C for 1 min in a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The genotypes were determined using Applied Biosystems software with no previous knowledge of the participants’ clinical data (*Figure 2*).

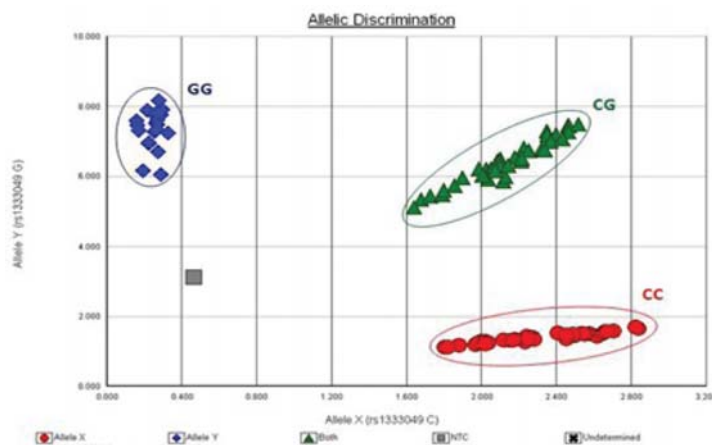
### Statistical analysis

Data are expressed as percentages or means  $\pm$  standard deviation, except in the case of outliers in continuous variables, when they are presented as medians or a logarithmic transformation was performed.

Allele and genotype frequencies are calculated by gene counts and compared between cases and controls by the chi-square test. Pearson’s chi-square test was used to test deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, based on observed and expected genotype frequencies<sup>(14, 15)</sup>. The Student’s t test was used for continuous variables to compare means between groups; when these had a non-normal

Figura 2. Discriminação genotípica do SNP rs1333049. Aparelho 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems)

Figure 2. Genotyping of the SNP rs1333049 in a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).





## Análise Estatística

Os dados são expressos em percentagem (%) ou média  $\pm$  desvio padrão, mas quando as variáveis contínuas apresentavam valores extremos (*outliers*), os dados são apresentados pela mediana ou com transformação logarítmica.

As frequências alélicas e genotípicas são calculadas pela contagem dos genes e comparadas, entre casos e controlos, pelo teste do  $\chi^2$  quadrado. Para testar o desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi efectuado o teste do  $\chi^2$  de Pearson, usando as frequências genotípicas observadas e as esperadas<sup>(14-15)</sup>. Para comparar as médias entre grupos foi usado o teste *t de Student*, para as variáveis contínuas, e sempre que as mesmas não apresentavam uma distribuição normal, foi-lhes aplicada uma transformação logarítmica ou usados testes não paramétricos (*Kruskal Wallis*). Os resíduos, são definidos como os valores observados menos os valores preditos, baseados em factores de “confundimento”, sendo usados na análise de associação genótipo-fenótipo (análise de variância one way ANOVA). Para testar a associação, expressa em coeficiente  $\beta$  por alelo C, entre o alelo C do polimorfismo rs1222049 e as características basais (expressas como variáveis contínuas e independentes), pressão arterial sistólica e diastólica, diabetes, IMC, alcoolemia, colesterol total, LDL e HDL, fibrinogénio, Apo B, Lp(a), PCR (as) e VOP, foi usado um modelo de regressão linear.

A força da associação foi expressa pelo *odds ratio* (OR) assim como pelos intervalos de confiança (IC) a 95%. Um valor de  $p < 0,05$ , foi considerado estatisticamente significativo. Para determinar, em análise multivariada, os factores associados com DC, foi construído um modelo de regressão logística pelo método *forward wald*, após ajuste para idade, sexo e factores de risco clássicos. Foi utilizado o software estatístico SPSS versão 14.0.

## RESULTADOS

O Quadro I apresenta diferenças significativas entre os dois grupos, pois as percentagens de diabetes tipo2, hipertensão arterial (HTA),

distribuição a logarítmica transformação was performed or a non-parametric test (*Kruskal-Wallis*) was applied. Residuals were defined as observed minus expected values based on confounding factors and were used in genotype-phenotype association analyses (one-way ANOVA). A linear regression model was used to test the association (expressed as the  $\beta$  coefficient for the C allele) between the C allele of the rs1222049 polymorphism and baseline characteristics (expressed as continuous and independent variables): systolic and diastolic blood pressure (BP), diabetes, BMI, blood alcohol, total, LDL and HDL cholesterol, fibrinogen, apolipoprotein B, lipoprotein(a), high-sensitivity C-reactive protein (CRP) and pulse wave pressure.

The strength of the association was expressed as odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI). A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. A forward Wald logistic regression model was constructed, adjusted for age, gender and conventional risk factors, to determine the factors associated with CAD in multivariate analysis. The statistical software used was SPSS version 14.0.

## RESULTS

Table I shows that there were significant differences between the groups, the prevalences of diabetes, hypertension, obesity, dyslipidemia and smoking being significantly higher in cases than in controls. Blood glucose, blood alcohol, triglycerides and CRP were also significantly higher in the coronary patients, while plasma HDL cholesterol was higher in controls. Systolic and diastolic BP were significantly higher in cases, and fibrinogen was also slightly higher, but without statistical significance.

The frequency of the CC genotype of the SNP rs1333049 was 35.7% in cases and 29.3% in controls, with OR 1.34; 95% CI 1.06-169;  $p=0.010$ , while the GG (unmutated) genotype had a significant protective effect (OR 0.62; 95% CI 0.47-0.42;  $p=0.0004$ ). The presence of the C allele, in 60% of cases and

obesidade, dislipidemia, tabagismo e consumo de álcool são mais elevadas, de forma significativa, nos doentes em relação aos controlos. Os níveis plasmáticos de glicemia, triglicédeos e PCR (as) são mais elevados, com significância estatística, nos doentes coronários e os níveis plasmáticos de colesterol HDL, são mais elevados nos controlos. Os valores de pressão arterial tanto sistólica como diastólica, são mais elevados nos doentes, de forma significativa, mas o fibrinogénio foi tendencialmente mais elevado nos doentes, sem, no entanto, apresentar significância estatística.

53% of controls, was significantly associated with CAD (OR 1.33; 95% CI 1.14-1.55,  $p=0.0002$ ).

Application of Pearson's chi-square test to the observed and expected genotype frequencies gave a value of 0.022 for the coronary patients and 2.22 for controls. As the 5% level of significance for one degree of freedom is 3.84 and the value obtained was less than this figure in both cases and controls, the null hypothesis ( $H_0$ ) was rejected and hence the population is in Hardy-Weinberg equilibrium.

One-way ANOVA showed no significant

Quadro I. Características basais da população

Características	Total (n=1406)	Casos (n=723)	Controlos (n=683)	Valor-p
Idade (anos)	53,5 ± 9,7	53,7 ± 8,9	53,3 ± 10,5	0,387
Sexo M (%)	1083(77,0%)	578 (79,9%)	505 (73,9%)	0,007
HTA (%)	704 (50,1%)	416 (57,5%)	288 (42,2%)	<0,0001
Diabetes (%)	324 (23%)	240 (33,2%)	324 (23%)	<0,0001
Obesidade (%)	397(28,2%)	231(32,0%)	166 (24,3%)	<0,001
Tabagismo (%)	484 (34,4%)	325 (45,0%)	159 (23,3%)	<0,0001
Consumo de álcool (gr/dia)	0,8	1,6	0,0	<0,0001
Dislipidemia (%)	1246 (88,6%)	694 (96,0%)	552 (80,8%)	<0,0001
Glicémia (mg/dl)	102,0	107,0	98,0	<0,0001
Triglicéridos (mg/dl)	132,0	152,0	115,0	<0,0001
HDL (mg/dl)	44,6 ± 14,6	38,5 ± 10,3	51,2 ± 15,7	<0,0001
PA sistólica (mm Hg)	135,5 ± 20,4	136,4 ± 20,2	134,4 ± 20,6	0,040
PA diastólica (mm Hg)	81,2 ± 11,3	81,7 ± 11,2	80,8 ± 11,5	0,206
Fibrinogénio (mm Hg)	348,9±94,1	344,9±96,6	341,1±96,7	0,397
Lp(a) (mg/dl)	16,5	20,8	15,2	0,010
PCR(as) mg/dl	2,0	3,0	1,6	<0,0001
VOP (m/seg.)	10,3 ± 2,7	10,5 ± 2,3	10,1 ± 3,1	0,007

HTA- Hipertensão Arterial, Lp (a)-Lipoproteína (a), HDL- High Density Lipoprotein, PCR(as)-Proteína C Reactiva de alta sensibilidade, VOP- Velocidade da Onda de Pulso.

Table I. Demographic and clinical characteristics of the population

	Total (n=1406)	Cases (n=723)	Controls (n=683)	p
Age (years)	53.5±9.7	53.7±8.9	53.3±10.5	0.387
Male (%)	1083(77.0%)	578 (79.9%)	505 (73.9%)	0.007
Hypertension (%)	704 (50.1%)	416 (57.5%)	288 (42.2%)	<0.0001
Diabetes (%)	324 (23%)	240 (33.2%)	324 (23%)	<0.0001
Obesity (%)	397(28.2%)	231(32.0%)	166 (24.3%)	<0.001
Smoking (%)	484 (34.4%)	325 (45.0%)	159 (23.3%)	<0.0001
Alcohol consumption (g/day)	0.8	1.6	0.0	<0.0001
Dyslipidemia (%)	1246 (88.6%)	694 (96.0%)	552 (80.8%)	<0.0001
Blood glucose (mg/dl)	102.0	107.0	98.0	<0.0001
Triglycerides (mg/dl)	132.0	152.0	115.0	<0.0001
HDL cholesterol (mg/dl)	44.6±14.6	38.5±10.3	51.2±15.7	<0.0001
Systolic BP (mmHg)	135.5±20.4	136.4±20.2	134.4±20.6	0.040
Diastolic BP (mmHg)	81.2±11.3	81.7±11.2	80.8±11.5	0.206
Fibrinogen (mg/dl)	348.9±94.1	344.9±96.6	341.1±96.7	0.397
Lipoprotein(a) (mg/dl)	16.5	20.8	15.2	0.010
hs-CRP (mg/dl)	2.0	3.0	1.6	<0.0001
PWV (m/s)	10.3±2.7	10.5±2.3	10.1±3.1	0.007

BP: blood pressure; HDL: high-density lipoprotein; hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; PWV: pulse wave velocity

O genótipo CC do SNP rs1333049 apresentou uma frequência de 35,7% nos casos e de 29,3% nos controlos com um *odds ratio* (OR) de 1,34; IC 1,06-1,69;  $p=0,010$  e o GG, não mutado, foi protector, de forma significativa, (OR 0,62; IC 0,47-0,82;  $P=0,0004$ ). A presença do alelo C, com 60% nos casos e 53% nos controlos, associou-se de forma significativa com a DC (*Odds ratio*=1,33; IC 1,14-1,55,  $p=0,0002$ ).

Após ter sido efectuado o teste do  $\chi^2$  de Pearson usando as frequências genótípicas observadas e as esperadas, o valor foi de 0,022 para os doentes coronários e 2,22 para os controlos. Sendo o nível de significância de 5% para 1 grau de liberdade = 3,84 e como o valor obtido é inferior a 3,84, tanto nos casos como nos controlos, a hipótese nula ( $H_0$ ) foi rejeitada logo a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Quadro II).

association between the CC, CG and GG genotypes of the SNP rs1333049 and demographic variables, phenotypic characteristics and biochemical markers of our population (Table III).

Linear regression analysis revealed no significant association between the C allele and risk factors or biochemical markers (Table IV).

After multivariate logistic regression analysis, the CC genotype remained in the equation with OR 1.711; 95% CI 1.097-2.668;  $p=0.018$ , and the heterozygous genotype CG with OR 1.530; 95% CI: 1.005-2.330;  $p=0.048$ , demonstrating that both are independent risk factors for CAD (Table V).

## DISCUSSION

The risk allele (C) of the SNP rs1333049, which is very common, has been investigated

Quadro II. Frequência genotípica, alélica associação do SNP rs1333049 com DC, na população portuguesa. Equilíbrio de Hardy Weinberg

SNP rs1333049	Casos (n=723)	Controlos (n=683)	OR (95% IC)	Valor-p
CC	258 (35,7%)	200 (29,3%)	1,34 (1,06 – 1,69)	0,010
CG	348 (48,1%)	321 (47,0%)	1,05 (1,84 – 1,30)	0,670
GG	117 (16,2%)	162 (23,7%)	0,62 (0,47 – 0,82)	0,0004
Frequência alélica C	0,60	0,53	1,33 (1,14 – 1,55)	0,0002
Frequência alélica G	0,40	0,37		
HWE ( $\chi^2$ )	0,022	2,228	1,504 (toda a população)	

HWE- Equilíbrio de Hardy- Weinberg.

Table II. Genotype frequency, allele association of the SNP rs1333049 with CAD, and Hardy-Weinberg equilibrium

SNP rs1333049	Cases (n=723)	Controls (n=683)	OR (95% CI)	p
CC	258 (35.7%)	200 (29.3%)	1.34 (1.06 – 1.69)	0.010
CG	348 (48.1%)	321 (47.0%)	1.05 (1.84 – 1.30)	0.670
GG	117 (16.2%)	162 (23.7%)	0.62 (0.47 – 0.82)	0.0004
C allele frequency	0.60	0.53	1.33 (1.14 – 1.55)	0.0002
G allele frequency	0.40	0.37		
HWE (chi-square test)	0.022	2.228	1.504 (total population)	

HWE: Hardy-Weinberg equilibrium

Após análise do Quadro III (análise de variância *one way ANOVA*), não houve associação significativa entre os genótipos CC, CG e GG do SNP1333049 e as variáveis demográficas, características fenotípicas e marcadores bioquímicos da nossa população (Quadro III).

in a white population in a genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls published in *Nature* in 2007<sup>(16)</sup>. This study investigated other SNPs on chromosome 9p21, with the strongest signal for association with CAD



Quadro III. Características fenotípicas da população e sua associação com os genótipos (CC, CG e GG) do SNP1333049.

Características Fenotípicas	SNP1333049			Valor p
	CC	CG	GG	
Idade (Anos)	53,9 ± 9,9	53,4 ± 9,7	54,0 ± 9,3	0,710
Sexo M %	354 (77,3%)	515 (77,0%)	214 (76,7%)	0,982
Diabetes %	104 (22,7%)	153 (22,9%)	67 (24,0%)	0,910
HTA %	236 (51,5%)	325 (48,6%)	143 (51,3%)	0,565
Dislipidemia %	411 (89,7)	595 (88,9%)	240 (86,0%)	0,286
Hábito fumar %	158 (34,5%)	236 (35,3%)	90 (32,3%)	0,672
Obesidade %	134 (29,3%)	188 (28,1%)	75 (26,9%)	0,781
Álcool gr/dia	22,5 ± 56,1	26,4 ± 64,9	21,9 ± 55,5	0,784
Log Colest. Total	2,29 ± 0,1	2,30 ± 0,1	2,31 ± 0,1	0,605
LDL mg/dl	117,4 ± 39,4	117,7 ± 38,7	119,9 ± 40,8	0,708
HDL mg/dl	44,0 ± 13,8	44,2 ± 14,3	46,7 ± 16,5	0,101
Triglicéridos mg/dl	164,9 ± 124,3	164,5 ± 123,7	170,5 ± 148,2	0,933
Glicemia mg/dl	115,2 ± 45,4	115,4 ± 44,5	117,3 ± 47,6	0,951
Fibrinogénio mg/dl	348,9 ± 94,1	344,9 ± 96,6	341,1 ± 96,7	0,397
PCR (as) mg/dl	3,7 ± 6,1	3,8 ± 5,3	3,7 ± 5,6	0,488
√Apo B	10,3 ± 1,4	10,3 ± 1,3	10,3 ± 10,4	0,274
Lp(a) mg/dl	31,3 ± 37,0	31,43 ± 31,4	27,4 ± 28,8	0,314

Apo B100-Lipoproteína B 100, HTA-Hipertensão Arterial, Lp(a)-Lipoproteína (a), HDL- High Density Lipoprotein, LDL-Low Density Lipoprotein, PCR(as)-Proteína C Reactiva de alta sensibilidade.

Table III. Demographic variables, phenotypic characteristics and biochemical markers of the study population and their association with the CC, CG and GG genotypes of the SNP rs1333049

	SNP rs1333049			p
	CC	CG	GG	
Age (years)	53.9±9.9	53.4±9.7	54.0±9.3	0.710
Male (%)	354 (77.3%)	515 (77.0%)	214 (76.7%)	0.982
Diabetes %	104 (22.7%)	153 (22.9%)	67 (24.0%)	0.910
Hypertension (%)	236 (51.5%)	325 (48.6%)	143 (51.3%)	0.565
Dyslipidemia (%)	411 (89.7)	595 (88.9%)	240 (86.0%)	0.286
Smoking (%)	158 (34.5%)	236 (35.3%)	90 (32.3%)	0.672
Obesity %	134 (29.3%)	188 (28.1%)	75 (26.9%)	0.781
Alcohol consumption (g/day)	22.5±56.1	26.4±64.9	21.9±55.5	0.784
Log total cholesterol	2.29±0.1	2.30±0.1	2.31±0.1	0.605
HDL cholesterol (mg/dl)	117.4±39.4	117.7±38.7	119.9±40.8	0.708
HDL cholesterol (mg/dl)	44.0±13.8	44.2±14.3	46.7±16.5	0.101
Triglycerides (mg/dl)	164.9±124.3	164.5±123.7	170.5±148.2	0.933
Blood glucose (mg/dl)	115.2±45.4	115.4±44.5	117.3±47.6	0.951
Fibrinogen (mg/dl)	348.9±94.1	344.9±96.6	341.1±96.7	0.397
hs-CRP (mg/dl)	3.7±6.1	3.8±5.3	3.7±5.6	0.488
√Apo B	10.3±1.4	10.3±1.3	10.3±10.4	0.274
Lipoprotein(a) (mg/dl)	31.3±37.0	31.43±31.4	27.4±28.8	0.314

Apo B: apolipoprotein B-100; HDL: high-density lipoprotein; hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; LDL: low-density lipoprotein

Quadro IV. Associação do alelo C com as variáveis contínuas (expressa em coeficiente β por alelo C)

Variáveis	Coeficiente-β	Valor p
PAS	-1,366	0,261
PAD	-0,501	0,457
IMC	-0,017	0,960
Glicemia	0,168	0,951
Álcool	3,912	0,294
Log Colesterol Total	0,001	0,868
LDL	0,261	0,912
HDL	0,228	0,790
Triglicéridos	-0,380	0,960
Fibrinogénio	-0,476	0,496
Lp(a)	0,120	0,963
PCR (as)	0,113	0,794
√Apo B	0,069	0,508
VOP	0,135	0,418

PCR (as)-Proteína C reactiva de alta sensibilidade; Lp(a)- Lipoproteína a; Apo B – Raiz Quadrada da Apolipoproteína B100; VOP- Velocidade da Onda de Pulso; Log- Logaritmo; PAS- Pressão Arterial Sistólica; PAD- Pressão Arterial diastólica; IMC- Índice de Massa Corporal.

Table IV. Association of the C allele with continuous variables (expressed as β coefficient for the C allele)

	β coefficient	p
SBP	-1.366	0.261
DBP	-0.501	0.457
BMI	-0.017	0.960
Blood glucose	0.168	0.951
Alcohol consumption	3.912	0.294
Log total cholesterol	0.001	0.868
LDL cholesterol	0.261	0.912
HDL cholesterol	0.228	0.790
Triglycerides	-0.380	0.960
Fibrinogen	-0.476	0.496
Lipoprotein(a)	0.120	0.963
hs-CRP	0.113	0.794
√Apo B	0.069	0.508
PWV	0.135	0.418

Apo B: apolipoprotein B-100; BMI: body mass index; DBP: diastolic blood pressure; HDL: high-density lipoprotein; hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; LDL: low-density lipoprotein; PWV: pulse wave velocity; SBP: systolic blood pressure

Após análise do Quadro IV (Regressão linear), não se verificou associação significativa entre o alelo C do SNP rs1333049 e as variáveis fenotípicas, consideradas factores de risco, ou os marcadores bioquímicos.

being seen at rs1333049 ( $p=1.8 \times 10^{-14}$ ). As stated above, an association was found across a region of over 100 kb that had not been highlighted in previous studies and that contains the coding sequences of two genes,

Quadro V. Variáveis associadas de forma independente com DC

Variáveis	B	S.E.	Wald	df	Odds Ratio (IC 95%)	Valor-p
Sexo	0,329	0,191	3,140	1	1,404 (0,965-2,042)	0,076
Diabetes	0,922	0,204	21,343	1	2,513 (1,684-3,751)	<0,0001
Hábito fumar	0,857	0,175	23,989	1	2,356 (1,672-3,319)	<0,0001
Dislipidemia	1,639	0,323	25,802	1	5,151 (2,737-9,695)	<0,0001
PCR(as)	0,047	0,017	7,802	1	1,048 (1,014-1,084)	0,005
Lp (a)	0,007	0,002	9,728	1	1,008 (1,003-1,012)	0,002
Fibrinogénio	0,04	0,001	12,284	1	1,004 (1,002-1,006)	<0,0001
Rs1333049			5,865	2		0,040
CC	0,537	0,227	5,612	1	1,711 (1,097-2,668)	0,018
CG	0,456	0,226	4,069	1	1,530 (1,005-2,330)	0,048
Constante	-5,238	0,647	65,535	1		<0,0001

Entraram na equação: idade, sexo, HTA, dislipidemia, diabetes, hábito de fumar, obesidade, PCR(as), fibrinogénio, Lp(a), SNP rs133349. B – Coeficiente estimado, com erro padrão S.E.; df – Graus de liberdade; Sig. – Significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Table V. Variables independently associated with CAD

	$\beta$	SE	Wald	df	Odds Ratio (95% CI)	p
Gender	0.329	0.191	3.140	1	1.404 (0.965-2.042)	0.076
Diabetes	0.922	0.204	21.343	1	2.513 (1.684-3.751)	<0.0001
Smoking	0.857	0.175	23.989	1	2.356 (1.672-3.319)	<0.0001
Dyslipidemia	1.639	0.323	25.802	1	5.151 (2.737-9.695)	<0.0001
hs-CRP	0.047	0.017	7.802	1	1.048 (1.014-1.084)	0.005
Lipoprotein(a)	0.007	0.002	9.728	1	1.008 (1.003-1.012)	0.002
Fibrinogen	0.04	0.001	12.284	1	1.004 (1.002-1.006)	<0.0001
rs1333049			5.865	2		0.040
CC	0.537	0.227	5.612	1	1.711 (1.097-2.668)	0.018
CG	0.456	0.226	4.069	1	1.530 (1.005-2.330)	0.048
Constant	-5.238	0.647	65.535	1		<0.0001

The following variables were included in the equation: age, gender, hypertension, dyslipidemia, diabetes, smoking, obesity, hs-CRP, fibrinogen, lipoprotein(a), and rs133349.  $\beta$ : estimated coefficient; SE: standard error; df: degrees of freedom

Após análise multivariada de regressão logística (Quadro V), o genótipo CC ficou na equação com um OR de 1,711; IC: 1,097-2,668;  $p=0,018$ , e o genótipo heterozigoto CG com um OR de 1,530; IC: 1,005-2,330;  $p=0,048$ , mostrando serem ambos factores de risco independentes para DAC.

## DISCUSSÃO

O alelo de risco (C) do SNP rs1333049, extremamente frequente, foi investigado na população Caucasiana, no Genome-Wide Association Study (Study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared con-

CDKN2A and CDKN2B, which code for two cyclin-dependent kinase inhibitors that inhibit the cell cycle. Both genes have multiple isoforms, have an important role in the regulation of the cell cycle, and are widely expressed in many tissues. The normal progression of the cell cycle is mediated by the activity of the cyclin-dependent protein kinases CDK4 and CDK6, which are inhibited by the proteins P16<sup>INK4a</sup> and p15<sup>INK4b</sup>. Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) induces the expression of p15, which inhibits cell proliferation, and thereby induces the G1 phase of the cell cycle (arrest)<sup>(17, 18)</sup>. Deletion of regions harboring genes that code for proteins that suppress the cell cycle may increase expression of genes

*trols. Wellcome Trust Case Control Consortium*) e publicado na revista *Nature* em 2007<sup>(16)</sup>. Neste estudo foram investigados outros SNPs na área do Cromossoma 9p21 tendo o rs1333049 mostrado o sinal mais forte de associação com DC. Como já foi dito, foi encontrada associação ao longo de uma região, que ainda não tinha sido assinalada, de mais de 100 kilobases (Kb) que continha sequências de genes codificantes, inibidores do ciclo celular, os inibidores dependentes das duas ciclinas cinases, *CDKN2A* e *CDKN2B*. Ambos os genes são supressores do ciclo celular, têm múltiplas isoformas e apresentam um papel importante na regulação deste ciclo, expressando-se em muitos tecidos. Como sabemos, a progressão normal do ciclo celular é promovida pela actividade das ciclinas dependentes das proteína kinases CDK4 e CDK6, que são inibidas pelas proteínas P16<sup>INK4a</sup> e p15<sup>INK4b</sup>. O factor de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF $\beta$ ) ao induzir a expressão da proteína p15 que por sua vez inibe a proliferação celular induz a fase-G1 (paragem do ciclo celular)<sup>(17-18)</sup>. A deleção de zonas portadoras dos genes que codificam estas proteínas supressoras do ciclo celular, podem originar expressão aumentada dos genes que promovem a proliferação celular e assim o aparecimento de aterosclerose e cancro. Além do *CDKN2A* e do *CDKN2B*, o único gene conhecido nas proximidades é o *MTAP* que codifica a metil-tioadenosina fosforilase (*MTAP*), uma enzima que contribui para o metabolismo da poliamina e se pode expressar em muitos tecidos humanos inclusivamente no sistema cardiovascular<sup>(19, 20)</sup>.

O locus 9p21 é uma região genética particular, pois é bem conhecida dos especialistas em cancro genético por ser um dos locais que apresenta maior número de deleções, que conduzem a formas hereditárias de melanoma maligno<sup>(21)</sup> e os investigadores que se têm dedicado ao estudo deste locus de risco, têm procurado uma explicação fisiopatológica lógica para a sua forte associação com a DAC.

Grande esforço tem sido efectuado para identificar as variantes genéticas codificadoras com repercussão funcional, nesse local.

that promote cell proliferation and thus atherosclerosis and cancer. Besides *CDKN2A* and *CDKN2B*, the only other known gene nearby is *MTAP*, which encodes methylthioadenosine phosphorylase, an enzyme that contributes to polyamine metabolism and is expressed in many human tissues, including the cardiovascular system<sup>(19, 20)</sup>.

The 9p21 locus is well known to cancer specialists as presenting a particularly large number of deletions that lead to hereditary forms of malignant melanoma<sup>(21)</sup>. Those investigating this risk locus have also sought a pathophysiological explanation for its strong association with CAD, and considerable effort has gone into identifying genetic variants at this site that have functional repercussions. Studies by Horne et al. suggest that the primary effect is on the vessel wall, and again focus attention on *CDKN2A* and *CDKN2B*, which code for two cyclin-dependent kinase inhibitors that play an important role in regulation of the cell cycle and may be implicated in the pathogenesis of atherosclerosis<sup>(22)</sup>.

At the *INK4* locus there is a large antisense gene for non-coding RNA, 20 exons long, that spans the 58-kb region of coronary risk, with multiple transcripts and unknown functions, designated *ANRIL*. Studies by Holdt et al.<sup>(23)</sup> demonstrated that *ANRIL* is expressed in various tissues and cells affected by atherosclerosis. Transcript-specific primers yield short (DQ485454) or long (DQ485453) transcripts; expression of the short transcripts was significantly increased in carriers homozygous for the C allele, while the same allele was associated with a decrease of expression of the long *ANRIL* variant. Increased expression of the long variant was associated with increased expression of genes that regulate cell proliferation, particularly *CDKN2A* (p14 and p16) and *CDKN2B* (p15).

According to Holdt et al., alleles in the risk region of chromosome 9p21 may affect the expression of *ANRIL* but may also alter the expression of *CDKN2A* and *CDKN2B* through an effect mediated by *ANRIL* itself. Recent studies by Jarinova et al.<sup>(24)</sup> also showed that the risk allele (C) of the rs1333049 polymor-

Os estudos de Horne et al.<sup>(22)</sup> sugerem um efeito primário na parede do vaso e focam novamente a atenção sobre os genes inibidores dependentes das ciclinas cinase, *CDKN2A* e *CDKN2B*, que desempenham um papel importante na regulação do ciclo celular e podem estar implicados na patogénia da aterosclerose.

Existe também nesta zona, no locus *INK4*, um gene *antisense*, não codificante RNA, longo com 20 exões e que ultrapassa os 58 kb do intervalo de risco coronário, que é transcrito em múltiplas cópias e com funções desconhecidas, designado por *ANRIL*. Estudos de Lesca Holdt e col.<sup>(23)</sup> demonstraram que o *ANRIL* se expressa em vários tecidos e células afectadas pela aterosclerose, mas baseando-se nos *primers* utilizados, podiam obter uma expressão de transcritos de *ANRIL* com formas curtas (DQ4854549) ou formas longas (DQ485453). O nível de expressão de transcritos curtos estava aumentado de forma significativa nos portadores do alelo de risco C em homozigotia e o mesmo alelo associava-se com a redução da expressão da variante longa do *ANRIL*. Assim o aumento de expressão da variante longa associava-se com níveis elevados de expressão dos genes que controlam a proliferação celular, nomeadamente o *CDKN2A* (p14 e p16) e o *CDKN2B* (p15).

Segundo estes autores, os alelos, no intervalo de risco do cromossoma 9p21, poderiam alterar a expressão do *ANRIL*, mas também poderiam alterar a expressão dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B*, através de um efeito mediado pelo próprio gene *ANRIL*. Estudos recentes de Olga Jarinova et al.<sup>(24)</sup> também demonstraram que o alelo de risco (C) do polimorfismo 1333349 se associava com aumento da expressão das variantes curtas do gene *ANRIL* e reduzia a expressão da variante longa. A expressão no sangue total da variante longa do *ANRIL* está positivamente relacionada com a expressão do *CDKN2B* (supressor do ciclo celular) e o alelo de risco C está associado com uma expressão baixa de *CDKN2B* e *upregulation* dos grupos de genes envolvidos na proliferação celular.

Estes SNPs de risco cardiovascular situados dentro dos 58Kb desta região, podem

phism was associated with increased expression of the short *ANRIL* transcripts and decreased expression of the long form. Whole blood expression of the long variant of *ANRIL* was positively correlated with that of *CDKN2B*, an inhibitor of the cell cycle, and the C (risk) allele was associated with low expression of *CDKN2B* and upregulation of gene sets modulating cellular proliferation.

The SNPs associated with cardiovascular risk within this 58-kb region may orchestrate a series of molecular events that promote a proliferative response. They are associated with changes in expression of *ANRIL* transcription and of genes involved in regulation of the cell cycle.

There is evidence of an association with type 2 diabetes in the same region, although different SNPs are involved<sup>(25)</sup>.

The link with CAD has been found in genome-wide association studies by other investigators<sup>(26, 27)</sup>.

In the present study, on a sample of over 1000 participants, the SNP rs1333049 at the 9p21 locus was found in homozigosity (CC) in around 30% of healthy controls. The C allele presented an increased risk for CAD with an odds ratio of 1.7 in homozigosity and 1.5 in heterozigosity. These results are generally in agreement with studies in the literature on various populations.

According to McPherson et al.<sup>(28)</sup>, the C allele of rs1333049 is extremely common, since over 25% of white individuals are homozygous for the risk allele (CC) and have double the risk of early-onset CAD compared to those without this allele. This effect is independent of established risk factors including dyslipidemia, hypertension, diabetes, obesity and inflammatory markers and may indicate a new and important biological mechanism in the pathophysiology of CAD.

Samani et al. studied rs1333049 in the Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) dataset and found a frequency of homozygous CC carriers of 30.5% in cases and 23.0% in controls; for heterozygous CC individuals the figures were 49.9% in coronary patients and 48.7% in controls (OR 1.9

orquestrar uma série de eventos moleculares que promovem a resposta proliferativa e estão associados com alterações na expressão individual da transcrição do ANRIL e mudanças na expressão dos genes reguladores do ciclo celular.

Na mesma região existem evidências de associação com a diabetes tipo 2 mas são outros grupos de SNPs que estão envolvidos<sup>(25)</sup>.

A associação com a DAC foi também encontrada através de GWAS, por outros grupos de investigadores<sup>(26, 27)</sup>.

No presente estudo, recorrendo a uma amostra de mais de 1000 participantes, a variante rs1333049 no locus 9p21 apresentou-se em homozigotia CC em cerca de 30% dos controlos saudáveis.

Evidenciou um risco acrescido de aparecimento de DAC (odds ratio de 1,7 em homozigotia ou de 1,5 em heterozigotia).

Estes resultados, de um modo geral estão de acordo com o descrito na literatura, em várias populações estudadas.

Segundo Mac Pherson et al<sup>(28)</sup>, o rs1333049 é um polimorfismo extremamente comum, pois mais de 25% da população Caucasiana transporta os dois alelos de risco (homozigotia CC), significando um risco de início precoce de DAC duas vezes superior ao risco dos indivíduos que não transportam esses alelos.

Este efeito, no risco, é independente dos conhecidos factores de risco incluindo dislipidémia, hipertensão, diabetes, obesidade e marcadores de inflamação podendo estar implicado um novo mecanismo biológico muito relevante, na fisiopatologia da DAC.

Samani e al identificaram o locus cromossómico 9p21, fortemente associado com DAC, no Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) study encontrando para o *SNP rs1333049* uma frequência populacional em homozigotia CC de 30,5% nos casos e 23,0% nos controlos. Quando em heterozigotia CG a frequência populacional era 49,9% nos doentes coronários e 48,7% nos controlos, com um OR em homozigotia de 1,90 e em heterozigotia de 1,47 ( $p=1.1 \times 10^{-14}$ )<sup>(29, 30)</sup>.

No estudo do grupo do *Cardiogenics Consortium* liderado por Heribert Schunkert,

for homozygosity and 1.47 for heterozygosity) ( $p=1.1 \times 10^{-14}$ )<sup>(29, 30)</sup>.

In a study by the Cardiogenics Consortium group headed by Heribert Schunkert, after adjustment for covariates, rs1333049 was associated with CAD with OR 1.32, 95% CI 1.24-1.42. In a 2008 meta-analysis by the same group, of seven case-control studies with a total of 4654 cases and 5177 controls, the *SNP rs1333049* was genotyped; the risk allele was associated with CAD in all seven studies, with OR for heterozygosity of 1.3 and for homozygosity of 1.5<sup>(31)</sup>.

In 2008, this association was reproduced in Japanese and Korean populations. In the Japanese population, the CC genotype was associated with CAD, with OR 1.44 (95% CI 1.15-1.80;  $p=0.0013$ ) and the C allele with OR 1.30 (95% CI 1.13-1.49;  $p=0.00027$ ), while in the Korean population, the CC genotype presented an OR of 1.28 (95% CI 1.00-1.63;  $p=0.049$ ) and the C allele an OR of 1.19 (95% CI 1.02-1.38;  $p=0.025$ )<sup>(32)</sup>.

In the Portuguese population investigated in the present study, the risk allele was very common, with a frequency in homozygosity of 35.7% in cases and 29.3% in controls, higher than the figures reported by various previous studies. It can thus be assumed that this genotype is at least as important in the Portuguese population as in other studied populations.

Over 60% of the controls had one or two copies of the C allele, which means that this risk marker is extremely prevalent in this population.

As this was a selected population resident on an island (Madeira) with little genetic variety, these results cannot of course be extrapolated to other populations, even that of mainland Portugal. It would therefore be of considerable interest to investigate the prevalence and repercussions of this genetic variant in other Portuguese populations.

Multivariate logistic regression analysis showed that the risk allele presented an odds ratio of 1.7 in homozygosity and 1.5 in heterozygosity, meaning that individuals with two copies of the risk C allele have a 70% higher risk of CAD, and 50% higher with one copy,



após ajuste para as variáveis susceptíveis de confusão, a associação do SNP rs1333049 com DAC apresentou um odds ratio (OR) de 1.32 com um IC a 95% entre 1,24 e 1,42.

Numa meta-análise do mesmo grupo, efectuada em 2008 e envolvendo 7 estudos caso-controlo com um total de 4 645 doentes e 5177 controlos, foi genotipado o SNP rs1333049. O alelo de risco associou-se à DC em todos os 7 estudos incluídos, apresentando no total um OR em heterozigotia de 1,3 e em homozigotia de 1,5.<sup>(31)</sup>

Em 2008, esta associação foi reproduzida na população Japonesa e Coreana. Neste estudo, na população Japonesa o genótipo CC associou-se com a DC apresentando um OR de 1,44 (IC1,15-1,80;p=0.0013) e o alelo C um OR de 1,30 (IC1,13-1,49;p=0,00027) e na população Coreana o genótipo CC apresentou um OR de 1,28 (IC1,00-1,63; p=0.049) e o alelo C um OR de 1,19 (IC1,02-1,38;p=0.025)<sup>(32)</sup>.

Na população Portuguesa, investigada no presente estudo, o alelo de risco foi portanto extremamente comum, com uma frequência em homozigotia de 35,7% nos doentes coronários e 29,3% nos controlos, valores acima dos citados pelos vários trabalhos internacionais anteriores. Assim, podemos dizer que este genótipo será tanto ou mais importante nesta população portuguesa como o é em outras populações já estudadas.

A população controlo, com uma ou duas cópias do alelo de risco C, apresentou uma frequência superior a 60%, o que torna este marcador de risco extremamente prevalente nesta População.

Naturalmente, que sendo uma população seleccionada, residente numa ilha e com pouca mistura genética com o exterior, teria o máximo interesse conhecer a prevalência e agressividades desta variante genética noutras populações Portuguesas.

Após análise multivariada de regressão logística, este alelo de risco, apresentou em homozigotia um *odds ratio* de 1,7 e 1,5 em heterozigotia, significando que os indivíduos que possuem duas cópias do alelo de risco C têm um risco de DAC 70% superior ao risco daqueles que não têm nenhuma ou 50% supe-

than those with none. This result, which holds after controlling for other risk factors including gender and age, confirms that the significant difference in gender between cases and controls in the study did not affect its central finding: the risk associated with chromosome 9p21.

In our study, as in all the others cited, this risk variant was not linked to the phenotypic characteristics studied, including hypertension, diabetes, obesity, dyslipidemia, behavior (alcohol consumption) or biochemical risk markers (*Table III*). The risk is independent of all established risk factors, which may indicate a new biological pathway in the pathogenesis of CAD. The finding by McPherson et al. that the risk allele is more prevalent in those with severe and early-onset atherosclerosis than in the elderly suggests that this allele promotes CAD by accelerating atherosclerosis.

An interesting recent letter by Visel et al. published in *Nature* in March 2010<sup>(33)</sup> sheds some light on this process. The authors deleted the 70-kb non-coding interval on mouse chromosome 4 that is orthologous to the 9p21 risk interval in humans, and observed reduced expression of *CDKN2A* and *CDKN2B* in the mutant mice. They also saw a doubling of proliferation in aortic smooth muscle cells in culture, which is relevant to the appearance of atherosclerosis. Expression of genes that suppress cell proliferation was reduced and that of genes promoting proliferation was enhanced. These results suggest that the risk interval represented by the deleted region has a pivotal role in CAD progression by altering the dynamics of vascular cell proliferation.

In the present study, as expected, significant differences were found between cases and controls with regard to gender, BMI, hypertension, diabetes, smoking, alcohol consumption and biochemical markers. We aimed to minimize possible confounding due to these baseline differences by using multivariate analysis that included several confounding factors. Logistic regression showed that the rs1333049 variant at the 9p21 locus maintained or even increased the significance of

rior quando só apresentam um alelo de risco. Estes resultados, após controlo para os outros factores de risco incluindo sexo e idade, confirmam que a diferença significativa existente no sexo entre casos e controlos, não afecta o seu resultado central- o risco associado com o cromossoma 9 p21.

Também no nosso estudo, assim como em todos os outros já apresentados, esta variante de risco não se associou a qualquer dos fenótipos estudados, como hipertensão arterial, diabetes, obesidade, dislipidémia, comportamentos (hábito de beber) ou outros marcadores bioquímicos de risco (*Quadro III*). Este efeito no risco é independente de todos os conhecidos factores de risco, o que pode implicar um novo caminho biológico relevante na patogenia da DAC. O achado, descrito por Mc Pearson, de que a prevalência do alelo de risco era mais elevada nos doentes com aterosclerose severa e prematura em relação aos idosos, sugere que este alelo promove a DAC acelerando a aterosclerose.

Um artigo interessante de *Visel e al*, muito recente, publicado em Março de 2010 na revista *Nature*, esclarece um pouco mais este processo. Estes autores procederam à deleção de 70 Kb da região não codificada do cromossoma 4 do rato, o qual é ortólogo ao intervalo de risco do 9 p21 humano e observaram uma redução da expressão do CDKN2A e CDKN2B, no rato mutante. Foi também observada o dobro da capacidade proliferativa das células musculares lisas da aorta mutante, na cultura celular, facto relevante para o aparecimento de aterosclerose. Ao mesmo tempo que houve redução da expressão dos genes supressores da proliferação celular, houve aumento da expressão dos genes implicados na proliferação celular. Estes resultados sugerem que o intervalo de risco representado pela região que sofreu a deleção, tem um papel importantíssimo na progressão da DAC ao alterar a dinâmica da proliferação das células vasculares, podendo assim representar um novo mecanismo fisiopatológico para o aparecimento da DAC<sup>(33)</sup>.

No presente estudo, como era de prever, foram encontradas diferenças significativas

the associated risk. This result suggests that the mechanism of this variant is independent of conventional risk factors.

In case-control studies such as this, large cohorts are needed to confirm that genetic variants on chromosome 21 predispose to CAD. However, a considerable body of evidence has accumulated in recent years from studies in different populations, and it is likely that this strong association will also be confirmed in the Portuguese population.

## CONCLUSION

In the present study we replicated the close link between the new variant rs1333049 on the 9p21 chromosome and coronary artery disease in a Portuguese population.

The risk allele of this genetic variant is extremely common in the study population, occurring in homozygosity in 30% and in heterozygosity in 50%.

Homozygosity for the risk allele increases susceptibility to CAD by over 70%, and by over 50% in heterozygosity, which is unusual for an isolated genetic variant.

This variant was not associated with any of the conventional phenotypic risk factors, including hypertension, diabetes, obesity, smoking, alcohol consumption, or biochemical risk markers, which suggests that the mechanism of this variant is independent of such factors.

Inclusion of the CC genotype in genetic risk scores could help to identify individuals predisposed to CAD, and may be useful in preventive medicine by enabling health plans to be individualized for the prevention of this deadly and widespread disease.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the European Regional Development Fund's Operational Programme for the Enhancement of Economic Potential and Territorial Cohesion for the Autonomous Region of Madeira (INTERVIR+).

entre casos e controlos em relação ao sexo, índice de massa corporal, hipertensão arterial, diabetes, hábitos de fumar e beber e outros marcadores bioquímicos entre o grupo doente e o grupo de controlo. Tentámos minimizar os efeitos potenciais de confusão causados por estas diferenças basais, com uma análise multivariada, de regressão logística, na qual vários factores de confusão foram incluídos. No entanto, na regressão logística, a variante rs 1333049 do locus 9p21 manteve ou até acentuou o risco e a significância do mesmo. Este resultado sugere a independência do mecanismo desta variante em relação aos factores de risco tradicionais.

Em estudos caso-controlo, como o presente, serão necessários grandes *cohorts* populacionais para confirmar a predisposição para o aparecimento de DAC associado a estas variantes genéticas no cromossoma 9p21. No entanto, nos últimos tempos, têm-se acumulado evidências sólidas, através de estudos efectuados em diferentes populações, sendo provável que esta forte associação se confirme na população Portuguesa.

## CONCLUSÃO

Com o presente trabalho replicou-se numa população portuguesa a forte associação da nova variante rs1333049 do cromossoma 9p21 com a doença coronária.

Esta variante genética é extremamente comum na presente população, ocorrendo em homozigotia em cerca de 30% e em heterozigotia em cerca de 50% da população.

A homozigotia para este alelo de risco confere, na susceptibilidade para a DAC, um aumento de risco superior a 70%, e em heterozigotia um aumento de risco superior a 50% o que é raro numa variante genética isolada.

Esta variante não se associou a nenhum dos fenótipos de risco tradicionais nomeadamente hipertensão arterial, diabetes, obesidade, hábito de fumar, álcool ou outros marcadores bioquímicos de risco o que sugere a independência do mecanismo desta variante em relação aos factores de risco tradicionais.

A inclusão do genótipo CC, em *scores* de risco genético, pode permitir identificar indivíduos predispostos para DAC e revelar-se útil em medicina preventiva individualizando planos de saúde para a prevenção desta doença tão grave e prevalente.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, Programa Operacional de Valorização do Potencial Económico e Coesão Territorial da RAM (INTERVIR +).

Pedido de Separatas  
Address for reprints:

Maria Isabel Mendonça  
Unidade de Investigação do  
Hospital Dr. Nélito Mendonça (SESARAM)  
Avenida Luís de Camões nº57  
9004-514 Funchal  
Madeira, Portugal  
Tel: +351 291 744312  
Fax: +351 291 744312  
e-mail: dep.card@srs.pt

## BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 1999; 330:1041-6.
2. Murabito JM, Pencina MJ, Nam BH, et al. Sibling cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults. *JAMA* 2005; 294:3117-23.
3. Jonasdottir A, Jonasdottir A, Sigurdsson A et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007; 316:1491-3.
4. Larson MG, Atwood LD, Benjamin EJ, et al. Framingham Heart Study 100K project: genome-wide associations for cardiovascular disease outcomes. *BMC Med Genet* 2007; 8(Suppl. 1):S5.
5. Anderson JL, Horne BD. The 9p21 Locus and Coronary Heart Disease: Initiator, Promoter, or Precipitator? *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 487-489
6. Ake B, Sandberg T, Kestin Nilsson, et al. High Frequency of Multiple Melanomas and Breast and Pancreas Carcinomas in CDKN2A Mutation-Positive Melanoma Families. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2000); 92 (15): 1260-1266
7. Lon R, Cardon and Bell JI. Association study designs for complex disease. *Nature Reviews Genetics* 2001;2:91-99
8. Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP, Spertus JA. Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study. *JAMA* 2007; 297:1551-1561
9. Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined. A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000; 21: 1502-1513
10. Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-2497
11. Chobanian AV et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7) *JAMA* 2003; 289:2560-2572.
12. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2001;24(11):2017-8.
13. Pi-Sunyer FX. National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute North American Association for the Study of Obesity. The Practical Guide: Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. Obesity Education Initiative, NIH Publication Number 00-4084, October 2000
14. Guo S W, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48:361-372.
15. Wigginton J E, Cutler D.J, Agbécasis G R. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am. J. Hum. Gen* 2005; 76: 887-893.
16. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls The Wellcome Trust Case Control Consortium. *Nature* 2007; 447:661-678.
17. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371:257-261.
18. Kalinina N, et al. Smad Expression in Human Atherosclerotic Lesions: Evidence for Impaired TGF- $\beta$ /Smad Signaling in Smooth Muscle Cells of Fibrofatty Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24: 1391-1396
19. Hustinx SR, Leoni LM, Yeo CJ, et al. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Modern Pathology* 2005; 18:959-963
20. Baudhuin LM. Genetics of coronary artery disease: focus on genome wide association studies. *Am J Transl Res* 2009;1(3):221-234
21. Hayward NK. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene*, 2003; 22:3053-3062.
22. Horne BD, Carlquist JF, Muhlestein JB, Bair TL, Anderson JL. Association of variation in the chromosome 9p21 locus with myocardial infarction versus chronic coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet*.2008;1:85-92
23. Holdt LM; Beutner F; Scholz M et al. ANRIL Expression Is Associated With Atherosclerosis Risk at Chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb and Vasc Biol* 2010; 30:620-627.
24. Jarinova O, Stewart AF, Roberts R et al. . Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(10):1671-7
25. Doria A, Wojcik J, Xu R et al. Interaction between poor glycemic control and 9p21 locus on risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *JAMA* 2008;300(20):2389-97
26. Ye Shu, Willeit J, Kronenberg F, Xu Q, Kiechl S. Association of Genetic Variation on Chromosome 9p21 With Susceptibility and Progression of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:378-84.
27. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A et al. Common Variant on Chromosome 9p21 Affects the Risk of Myocardial Infarction. *Science* 2007;316(5846):1491-3
28. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N et al. A Common Allele on Chromosome 9 Associated with Coronary Heart Disease. *Science* 2007;316 (5830):1488-1491
29. Samani NJ, F. Erdmann J, Hall AS et al for the WTCCC and the Cardiogenics Consortium. Genomewide Association Analysis of Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2007; 357:443-53.
30. Samani NJ and Schunkert H. Chromosome 9p21 and Cardiovascular Disease: The Story Unfolds. *Circ Cardiovasc Genet* 2008; 1:81-84.
31. Schunkert H, Götz A, Braund P et al. The Cardiogenics Consortium. Repeated Replication and a Prospective Meta-Analysis of the Association between Chromosome 9p21.3 and Coronary Artery Disease. *Circulation* 2008; 117(13): 1675-1684.